

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-183479

(43)Date of publication of application : 09.07.1999

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 5/02

(21)Application number : 10-247373

(71)Applicant : FUJI ELECTRIC CO LTD

(22)Date of filing : 01.09.1998

(72)Inventor : KAWADA SHIKAKO
TANAKA YOSHIHARU

(30)Priority

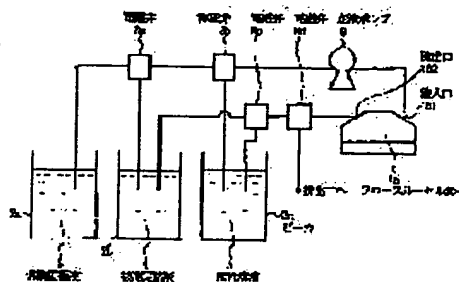
Priority number : 09283346 Priority date : 16.10.1997 Priority country : JP

(54) SENSOR FOR MEASURING SOLUTION AND METHOD FOR MEASURING SOLUTION COMPONENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a solution measuring sensor and a method for measuring a solution component which show stable characteristics, superior safety and ease of handling, enable measurement with a small quantity of a solution to be measured in a continuous reaction process and can be used repeatedly.

SOLUTION: Solenoid valves 8a and 8b and a liquid feed pump 9 are provided, which switch and feed a solution such as a phosphoric acid buffer solution 3, a liquid 4 to be measured, etc., to a flow through cell element 1a, and solenoid valves 8d and 8c are set, which discharge or collect the solution out of the element 1a. Since an antigen and an antibody bonded with each other can be dissociated efficiently by an acid solution 5, the element 1a can be used repeatedly. Moreover, a quantity of the solution required and a quantity of the solution consumed can be reduced to a minimum by switching the feed solution and discharge solution by the solenoid valves.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than withdrawal the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application] 26.04.2004

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-183479

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月9日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/543
5/02

識別記号
5 9 3

F I
G 0 1 N 33/543 5 9 3
5/02 A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-247373

(22) 出願日 平成10年(1998) 9月1日

(31) 優先権主張番号 特願平9-283346

(32) 優先日 平9(1997)10月16日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005234

富士電機株式会社

神奈川県川崎市川崎区田辺新田1番1号

(72) 発明者 川田 志加子

神奈川県川崎市川崎区田辺新田1番1号

富士電機株式会社内

(72) 発明者 田中 良春

神奈川県川崎市川崎区田辺新田1番1号

富士電機株式会社内

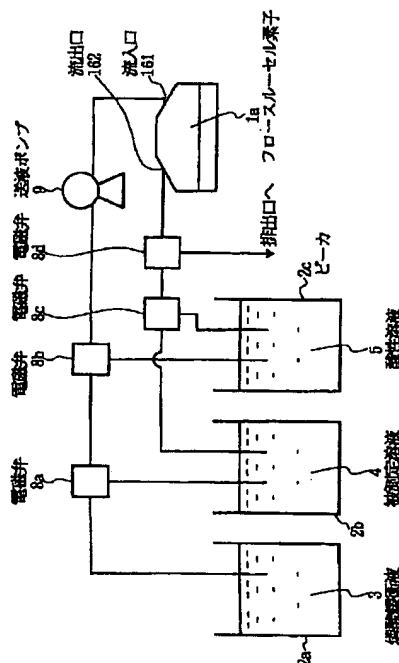
(74) 代理人 弁理士 篠部 正治

(54) 【発明の名称】 溶液測定用センサ及び溶液成分測定方法

(57) 【要約】

【課題】 特性が安定で、少量の被測定溶液で測定可能で、連続的に反応過程が測定でき、反復利用可能で、安全性及び取扱い易さに優れている溶液測定用センサ及び溶液成分測定方法を提供する。

【解決手段】 フロースルーセル素子1aに磷酸緩衝液3や被測定液4等の溶液を切り替えて供給させる電磁弁8a及び8bと送液ポンプ9とを備え、素子1aからの流出液を排出あるいは回収させるための電磁弁8d及び8cを備えている。酸性溶液5によって、結合した抗原と抗体とを効率よく解離させることができるので、素子1aの反復利用が可能となり、供給液及び排出液を電磁弁によって切り替えることによって、必要液量及び消費液量を最少限度に少なくすることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】被測定溶液に接触してその溶液中の特定成分を測定する溶液測定用センサであって、高分子膜が形成された水晶振動子を用いたフロースルーセル式の溶液測定用センサにおいて、

高分子膜は、溶液に接触する側の水晶振動子の電極表面に固定化された抗原または抗体を含む膜であり、被測定溶液または抗体を添加された被測定溶液と、磷酸緩衝液と、酸性溶液とを切り換えて高分子膜表面へ供給する切替え供給手段が備えられていることを特徴とする溶液測定用センサ。

【請求項2】前記高分子膜が固定化された抗原としてのカンファー・オボアルブミン複合体であることを特徴とする請求項1に記載の溶液測定用センサ。

【請求項3】前記酸性溶液が、クエン酸溶液、磷酸水素ナトリウムとクエン酸との混合溶液、あるいはグリシンの塩酸溶液であることを特徴とする請求項1に記載の溶液測定用センサ。

【請求項4】請求項1に記載の溶液測定用センサを用いた溶液成分測定方法であって、

少なくとも、

高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ磷酸緩衝液を流通させて基準発振周波数を計測する基準周波数計測工程と、

高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ被測定溶液または抗体が添加された被測定溶液を流通させて抗原と抗体とを免疫反応させた後、磷酸緩衝液を流通させて免疫反応を安定させて、その免疫反応による周波数変化を計測する免疫反応計測工程と、

高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ酸性溶液を流通させて免疫反応により結合した抗原と抗体とを分離させる解離工程と、

からなることを特徴とする溶液成分測定方法。

【請求項5】切替え供給手段により溶液を切り換えた際に、フロースルーセルから回収されてくる溶液が切替え前の溶液と切替え後の溶液との混合液である可能性のある時間間隔の間は、その回収溶液を廃液側へ排出し、混合液でない時間間隔の間は、元の溶液に戻すことを特徴とする請求項4に記載の溶液成分測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、溶液中に含まれる特定成分の濃度を測定するセンサ及び測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、水晶振動子の発振周波数の変化によって溶液中の特定成分の濃度を測定する方法がある。水晶振動子は、特定の結晶方位の水晶を薄く切断し、その両面に金や銀等の電極を真空蒸着法等で形成して得られる圧電素子であり、振動子固有の周波数で発振

する。この水晶振動子の電極表面上に吸着等で物質が付着して電極の重量が変化すると、その重量変化に伴って発振周波数が変化する。したがって、発振周波数の変化を測定することによって重量変化を検出することができる。このようなマイクロバランスセンサとして、気相系ではニオイセンサやガスセンサ（例えば、浅利征宏ほか、においを嗅ぎ分ける水晶振動子ガスセンサ、超音波TECHNO、3月号、53～57、1994）があり、液相系では免疫センサやDNAセンサ（例えば、岡畑恵雄、水晶振動子をデバイスとするDNAセンサ、蛋白質核酸酵素、Vol. 40, No. 2, 165～172, 1995）などがある。

【0003】この発明の発明者等が出願している特願平8-247476号には、抗原抗体反応を利用して水道水のカビ臭物質である2-メチルイソボルネオール（以下では、2-MIBと略称）を定量する2-MIBの検出方法が記載されている。これも、液相系における水晶振動子応用技術の1例である。この検出方法においては、2-MIBと類似の構造を有するカンファー・オボアルブミンと結合させたカンファー・オボアルブミン複合体を水晶振動子の電極表面に固定化し、これを既知濃度の抗体を混合した被測定溶液に浸漬し、抗体に対してカンファーと被測定溶液中の2-MIBとを競合的に反応させる。カンファー・オボアルブミン複合体に結合した抗2-MIB抗体量は水晶振動子の発振周波数の変化量として検出されるから、発振周波数の変化量を測定することによって溶液中に含まれている2-MIBの濃度を測定することができる。

【0004】また、重量変化とは別に、溶液の物性値の変化が水晶振動子の発振周波数を変化させる場合にも、この技術は応用できる。その例としては、溶液の粘度の測定（例えば、村松宏ほか、水晶振動子化学計測システム、超音波TECHNO、Vol. 7, No. 2, 28～34, 1995）が上げられる。水晶振動子が発振させるためには、水晶振動子の両面に形成されている電極に電圧を印加することが必要である。そのため、導電性を有する液相系において水晶振動子を利用する場合には、一方の電極を電気的に絶縁することが必要である。一般的には、図8に示すように、水晶振動子11が振動できる空間を確保しつつ、シリコーン樹脂等の疎水性絶縁物12によって一方の電極11bを被覆し、被測定溶液4を通して両電極11a及び11bの間に電流が流れないようにすることが必要である。

【0005】しかし、図8のような構成で測定する場合には、次のような問題点があり、実用的ではない。

(1) 疎水性の絶縁物質を用いて疎水性絶縁物12を水晶振動子11の電極11b上に形成する作業は比較的手間がかかり、その上十分な絶縁性を確保することが難しく、発振回路61や周波数カウンタ62やパソコン63、あるいは被測定溶液4の入ったビーカー2等に触れるとノイズが発生する。

【0006】(2) 疎水性絶縁物12で被覆した水晶振動

子11は容積が大きくなり、これら全体を被測定溶液4に浸漬して測定する場合には、多量（少なくとも30mL）の溶液が必要であり、被測定溶液や測定に必要な試薬の消費量が多くなる。

(3) 測定が回分式になるため、図示していない高分子膜と被測定溶液4中の測定対象成分との反応過程や、緩衝液による電極表面の洗浄過程等における発振周波数の変化を連続的に測定することが困難である。また、オンラインにおける連続測定にも不向きである。

【0007】以上のような問題点を解決できる成分測定用センサとしては、フロースルーセル式の成分測定用センサ（三浦則雄ほか、メタンフェタミンの高感度検出用としての免疫反応利用型水晶振動式センサ、CHEMICAL SENSORS, Vol. 7B, 53~56, 1991）がある。そのセンサの構造は図9に示す通りであり、アクリル樹脂からなる保持基板14と、溶液の流入通路及び排出通路を有するカバーとの間に、1対のシリコンゴム15を介して、両面に金電極（111等）を有する水晶振動子11が保持されている。カバー側のシリコンゴムの中央部は除去されていて、カバーと水晶振動子11とシリコンゴムとでフロースルーセルが構成されている。流入通路から供給される溶液は水晶振動子11の電極111上に流通されて電極111に接触した後、流出側から排出される。水晶振動子11の上下の金電極（111等）にはそれぞれにリード線13が接続されている。また、水晶振動子11の溶液に接触する側の電極111の表面には白金黒が形成されている。

【0008】このような構成のセンサでメタンフェタミンの濃度を測定する場合には、次の2つの方法を実施している。第1の方法では、モノクロナール抗体溶液をフロースルーセルに流通させて、電極111表面の白金黒にモノクロナール抗体（分子量約160,000）を吸着させ、磷酸緩衝液で洗浄した後、メタンフェタミン溶液あるいはメタンフェタミンとアルブミンとの複合体（分子量約67,000）溶液を流通させて抗原抗体反応によりメタンフェタミンあるいはメタンフェタミンとアルブミンとの複合体を結合させ、その際の周波数変化を計測してメタンフェタミンの濃度を測定する。

【0009】第2の方法では、最初に、メタンフェタミンとアルブミンとの複合体溶液を流通させて、電極111表面の白金黒に複合体を吸着させ、磷酸緩衝液で洗浄した後、一定濃度のモノクロナール抗体を流通させて抗原抗体反応によりモノクロナール抗体を結合させ、その際の周波数変化を計測してメタンフェタミンの濃度を測定する。

【0010】これらの2つの方法を比べると、周波数の変化を計測する際の重量変化の大きい後者の方が再現性が良好であるという。また、一旦結合した抗原と抗体とは、pH2のグリシンの塩酸溶液を流通させることによって解離させることができるという。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、図8で示したような従来の溶液測定用センサの上記の問題点を解決し、且つ図9で示した溶液測定用センサの特長を十分に活用できる、特性が安定で、少量の被測定溶液で測定することができ、連続的に反応過程を測定することができ、反復利用が可能であり、安全性及び取扱い易さに優れている溶液測定用センサ及び溶液成分測定方法を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】この発明においては、被測定溶液に接触してその溶液中の特定成分を測定する溶液測定用センサであって、高分子膜が形成された水晶振動子を用いたフロースルーセル式の溶液測定用センサにおいて、高分子膜は溶液に接触する側の水晶振動子の電極表面に固定化された抗原または抗体を含む膜であり、被測定溶液または抗体を添加された被測定溶液と磷酸緩衝液と酸性溶液とを切り換えて高分子膜表面へ供給する切替え供給手段が備えられている（請求項1の発明）。

【0013】切替え供給手段によって、水晶振動子の高分子膜への各種溶液の供給が連続的に切り換え可能となるので、連続的に反応過程を測定することが可能となり、且つ特性を安定化させることが容易となり、取扱いが容易になる。また、フロースルーセル構造にすることで溶液の置換が非常にスムーズとなるため、被測定溶液等の溶液の必要量を少なくすることが可能となる。更に、酸性溶液の供給は反復利用を可能とする。

【0014】また、前記高分子膜が、固定化された抗原としてのカンファー・オボアルブミン複合体である（請求項2の発明）。高分子膜に含まれる抗原がカンファー・オボアルブミン複合体である溶液測定用センサは、抗体の結合による出力変化を測定するので、特に低分子量の測定対象物質を検出するのに有効であり、優れた感度を有する。

【0015】更に、前記酸性溶液が、クエン酸溶液、磷酸水素ナトリウムとクエン酸との混合溶液、あるいはグリシンの塩酸溶液である（請求項3の発明）。これらの酸性溶液は、結合した抗原と抗体とを効果的に解離させることができ、且つ入手が容易で、安全性及び取扱い易さに優れている。以上の3つの発明は溶液測定用センサに関する発明であるが、溶液成分測定方法としては次の発明がある。

【0016】請求項1に記載の溶液測定用センサを用いた溶液成分測定方法であって、少なくとも、高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ磷酸緩衝液を流通させて基準発振周波数を計測する基準周波数計測工程と、高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ被測定溶液または抗体が添加された被測定溶液を流通させて抗原と抗体とを免疫反応させた後、磷酸緩衝液を流通させて免疫反応を安定させて、その免疫反応による周波数変化を計測する免疫反応計測工程と、高分子膜が形成された

水晶振動子の電極表面へ酸性溶液を流通させて免疫反応により結合した抗原と抗体とを解離させる解離工程と、からなる（請求項 4 の発明）。

【0017】上記の 3 つの工程を含むことによって、溶液測定用センサを連続的に繰り返して使用することができる。請求項 4 に記載の溶液成分測定方法において、切替え供給手段により溶液を切り換えた際に、フローセルから回収されてくる溶液が切替え前の溶液と切替え後の溶液との混合液である可能性のある時間間隔の間は、その回収溶液を廃液側へ排出し、混合液でない時間間隔の間は、元の溶液に戻す（請求項 5 の発明）。

【0018】このようにして回収可能な溶液を回収することによって、被測定溶液等の溶液を有効に再利用することができる。

【0019】

【発明の実施の形態】この発明による溶液測定用センサの実施の形態について実施例を用いて説明する。従来技術と同じ機能を有する部分については同じ符号を用いた。図 1 はこの発明による液体測定用センサの実施例の構成を示す概念図であり、図 2 はこの実施例におけるフローセル素子 1a（従来技術の項では、この素子に相当するものを液体測定用センサと称した）の構成を示す分解斜視図であり、図 3 は図 2 における水晶振動子 11 とフレキシブル基板 13 との位置関係を示す斜視図である。

【0020】まず最初に、フローセル素子 1a について説明する。水晶振動子 11 の電極 111a 及び 111b と、配線部材としてのフレキシブル基板 13 の端子 131a 及び 131b とは、図 3 に示すように配置されて接触させられる。すなわち、水晶振動子 11 の表側の電極 111b はフレキシブル基板 13 の右側裏面に露出している端子 131b に接触するように、水晶振動子 11 の右側がフレキシブル基板 13 の下側に挿入される。一方、水晶振動子 11 の裏側の電極 111a はフレキシブル基板 13 の左側表面に露出している端子 131a に接触するように、水晶振動子 11 の左側がフレキシブル基板 13 の上側に位置合わせされる。なお、水晶振動子 11 の電極 111a 及び 111b が端子 131a 及び 131b と接触する部分は、図 3 に示すように、表面側は右側に突出し、裏面側は左側に突出している。

【0021】フローセル素子 1a の構成は次の通りである。まず、4 隅に固定ネジ 17 を通す孔 142 を有するアクリル樹脂製の保持基板 14 上に、4 隅に同様の孔 152 を有し、中央部に水晶振動子 11 の電極 111 に対応してあけられている孔 151a を有するシリコンゴムからなる高分子弾性シート 15a が置かれ、その上に、上記で説明したように位置合わせされた水晶振動子 11 とフレキシブル基板 13 とが重ねられる。フレキシブル基板 13 の 4 隅にも、保持基板 14 と同様の孔 132 があけられている。更に、水晶振動子 11 とフレキシブル基板 13 との上に高分子

弾性シート 15a と同じ形状に加工された高分子弾性シート 15b が重ねられ、最上部にアクリル樹脂製のフローセル蓋部 16 が載せられる。このように配置された状態で固定ネジ 17 が保持基板 14 側から通され、フローセル蓋部 16 の 4 隅に形成されたネジ孔 165 にねじ込まれて、全体が一体に締めつけられる。なお、フローセル蓋部 16 に設けられている流入通路 163 及び流出通路 164 は高分子弾性シート 15b の孔（図 2 では接液孔）151b の位置に開口している。

【0022】固定ネジ 17 によって締めつけられることによって、高分子弾性シート 15a 及び 15b が水晶振動子 11 とフレキシブル基板 13 とを密着させて電極 111 と端子 131 とを電気的に十分に接触させ、同時に、高分子弾性シート 15a の孔 151a 及び高分子弾性シート 15b の接液孔 151b を除く部分が水晶振動子 11 及びフレキシブル基板 13 に密着して外部に対する気密状態を実現している。更に、高分子弾性シート 15a と保持基板 14、及び高分子弾性シート 15b とフローセル蓋部 16 も密着して外部に対する気密状態を実現している。

【0023】このようなフローセル素子 1a を用いた液体測定用センサは、フローセル素子 1a と、ピーカ 2a に入れられている、零点出力を得るため及び洗浄のための磷酸緩衝液 3（pH 7）と、ピーカ 2b に入れられている被測定溶液 4 と、ピーカ 2c に入れられている、結合した抗原と抗体とを解離させるための酸性溶液 5 と、これらの溶液 3、4 及び 5 の供給を切り替えるための電磁弁 8a 及び 8b と、溶液を流入口 161 からフローセル素子 1a へ送るための送液ポンプ 9（FLUID METERING-IN C. 製）と、フローセル素子 1a の流出口 162 から送り出された溶液を回収するか排出するかを切り替えるための電磁弁 8d と、回収溶液を切り替えるための電磁弁 8c とで構成されている。

【0024】流入口 161 からフローセル素子 1a 内へ送り込まれた溶液は、図 2 に示した流入通路 163 を通って接液孔 151b に至り、水晶振動子 11 の電極 111b に接触し、流出通路 164 を通って流出口 162 からフローセル素子 1a の外の配管に送られる。その流速はこの実施例においては 0.2 mL/分とした。この流速は、大き過ぎるとその運動エネルギーの影響によって測定に誤差を生ずるので、必要最少限度の値に設定される。

【0025】酸性溶液 5 としては、pH 2.2 のクエン酸溶液、pH 3.0 の磷酸水素ナトリウムとクエン酸との混合溶液、あるいは pH 2.2 のグリシンの塩酸溶液が適している。本発明の発明者等の検討結果によれば、水晶振動子 11 の電極 111b の表面に固定化した抗体あるいは抗原は、酸性溶液 5 に接触しても、初期にその約 10% が脱離するけれども、それ以降は殆ど脱離しないことが分かっている。したがって、酸性溶液による抗原と抗体の解離処理を施すことによって、繰り返し測定が可能となるのである。なお、解離処理に用いられる可能性のある溶液、例

えばアルカリ溶液や界面活性剂等、と比較すると、酸性溶液はその安全性及び取り扱い易さにおいて優れている。

【0026】図4は、電極111bの表面にカンファー・オボアルブミン複合体を固定化した水晶振動子11を有するフロッセル素子1aを用いて、被測定溶液4として2-MIB濃度が0mg/Lで抗2-MIB抗体濃度が0.01mg/mLに調整された溶液を用い、酸性溶液5として0.1mol/Lのグリシンを含む塩酸溶液(pH2.2)を用いて、水晶振動子11の発振周波数変化を記録した線図である。

【0027】操作の手順は次の通りである。

1) 電磁弁8a及び8bを磷酸緩衝液3側にし、電磁弁8dを排出口側にして、磷酸緩衝液3をフロッセル素子1aに30分間送液させ、水晶振動子11の発振周波数を安定させ、この時の発振周波数を基準(周波数変化量を0Hz)とする。

2) 電磁弁8a及び8bを酸性溶液5側に切り替え、電磁弁8dは排出口側のままにして、酸性溶液5をフロッセル素子1aに7分間送液させた後、電磁弁8d及び8cをビーカー2c側に切り替えて、酸性溶液4を回収させる。酸性溶液4を送液させた総時間は10分である。

【0028】3) 再び、電磁弁8a及び8bを磷酸緩衝液3側にし、電磁弁8dを排出口側にして、磷酸緩衝液3をフロッセル素子1aに10分間送液させ、水晶振動子11の発振周波数を安定させ、この時の発振周波数を被測定溶液に対する周波数変化の基準とする。1)、2)及び3)の工程は、電極111bの表面に不安定に固定化されているカンファー・オボアルブミン複合体を脱離させることを目的としている。

【0029】したがって、この3つの工程は、通常、電極表面111bに抗体あるいは抗原を固定化したままの新しい水晶振動子11を使い始める際に採用される工程であり、水晶振動子11を交換しないですそのまま繰り返し使用する場合には、省略されることが多い。

4) 電磁弁8a及び8bを被測定溶液4側に切り替え、電磁弁8dは排出口側のままにして、被測定溶液4をフロッセル素子1aに7分間送液させた後、電磁弁8d及び8cをビーカー2b側に切り替えて、被測定溶液4を回収させる。被測定溶液4を送液させた総時間は30分である。

【0030】5) 3度、電磁弁8a及び8bを磷酸緩衝液3側にし、電磁弁8dを排出口側にして、磷酸緩衝液3をフロッセル素子1aに15分間送液させ、水晶振動子11の発振周波数を安定させ、この時の発振周波数を測定する。この発振周波数と工程3)の発振周波数との差(周波数変化量)が水晶振動子11上のカンファー・オボアルブミン複合体に結合した抗2-MIB抗体量に相当し、この周波数変化量から図7に示すような検量線を用いて被測定溶液中の2-MIB濃度が算出される。

【0031】以上で、被測定溶液の測定は終了するが、

免疫反応で電極111b表面に結合した抗2-MIB抗体を電極111b表面から解離させて、次の測定に備えるために、

6) 再び、電磁弁8a及び8bを酸性溶液5側に切り替え、電磁弁8dは排出口側のままにして、酸性溶液5をフロッセル素子1aに7分間送液させた後、電磁弁8d及び8cをビーカー2c側に切り替えて、酸性溶液4を回収させる。酸性溶液4を送液させた総時間は10分である。

【0032】7) 4度、電磁弁8a及び8bを磷酸緩衝液3側にし、電磁弁8dを排出口側にして、磷酸緩衝液3をフロッセル素子1aに送液させ、水晶振動子11の発振周波数を安定させる。繰り返し測定される場合等の、1)、2)及び3)の工程が省略される場合には、この時の発振周波数が被測定溶液に対する周波数変化の基準となる。

【0033】以上の説明から明らかなように、工程3)と工程5)とにおける発振周波数の周波数変化量(ΔF)が、電極111bの表面に固定化されているカンファー・オボアルブミン複合体に結合した抗2-MIB抗体の量に相当している。なお、図4において、工程3)の発振周波数と工程7)の発振周波数とがほぼ同じレベルにあることから、カンファー・オボアルブミン複合体に結合した抗2-MIB抗体の大部分が酸性溶液4によって解離されていることが分かるであろう。

【0034】図5は、上述の測定工程を3回繰り返した場合の発振周波数の変化量(周波数変化量 ΔF)を、酸性溶液の種類をパラメータとして示した線図である。0.1mol/Lのグリシンを含む塩酸溶液(pH2.2)と、0.2mol/Lの磷酸水素ナトリウムと0.1mol/Lのクエン酸との混合溶液(pH3.0)とでは、 ΔF が減少していくことが分かり、抗2-MIB抗体との結合と解離を繰り返すことによって、解離できない抗2-MIB抗体が蓄積し、その結果として抗2-MIB抗体の結合量が減少しているものと推定される。しかし、センサとしての使用限界を、抗2-MIB抗体の結合による周波数変化量が初期値の50%となった時点とすると、8回程度の反復使用が期待できる。

【0035】一方、0.1mol/Lのクエン酸溶液(pH2.2)の場合には、このような ΔF の減少が認められないので、多数回の反復使用が十分に期待できる。図6は、図4と同じ構成のフロッセル素子1aと、同じ配合の被測定溶液4とを用い、酸性溶液5として0.2mol/Lの磷酸水素ナトリウムと0.1mol/Lのクエン酸との混合溶液(pH3.0)を用いて、被測定溶液の送液時間を10分にした繰り返し測定を7回実施した場合の水晶振動子11の発振周波数変化を記録した線図である。

【0036】この場合には、酸性溶液5の塩濃度が磷酸緩衝液3の塩濃度より高いために、酸性溶液5を送液した時の周波数変化量が磷酸緩衝液3を送液した時の周波数変化量より大きく測定されている。繰り返し測定にお

ける周波数変化量 (ΔF) は、酸性溶液 5 を送液した時の最終値が段々に高くなり、それに伴って、被測定溶液 4 による ΔF が減少し、7 回目の ΔF は第 1 回目の ΔF の約 67% となっている。センサとしての使用限界を、抗 2-MIB 抗体の結合による周波数変化量が初期値の 50% となった時点とすると、7 回以上の反復使用が可能であることが分かる。

【0037】図 7 は、水晶振動子 11 の被測定溶液 4 に接触する側の電極 11b 表面にカンファー・オボアルブミン複合体を固定化した 2-MIB 測定用のフロースルーセル素子 1a を用いた、図 4 等の場合と同様の溶液測定用センサで、被測定溶液 4 中の 2-MIB の濃度を 0.0001~0.1 mg/L の範囲で変えて測定した周波数変化量 (ΔF) を示す線図 (検量線) である。横軸が被測定溶液中の 2-MIB の濃度、縦軸が ΔF である。この場合においても、被測定溶液中の抗 2-MIB 抗体の濃度は 0.01 mg/mL に固定した。

【0038】水晶振動子 11 の電極 11b 上に固定化したカンファー・オボアルブミン複合体と結合した抗 2-MIB 抗体による周波数変化量 (ΔF) が、測定対象溶液中の 2-MIB の濃度の増加につれて減少し、ある濃度以上では一定値に収斂していることが分かる。このような検量線を用いることによって、発振周波数の変化量 ΔF から溶液中の未知濃度の 2-MIB を定量することができる。

【0039】上述の 2-MIB の定量が競合法によっているのは、2-MIB の分子量が約 170 であるのに対して、抗 2-MIB 抗体の分子量が約 160,000 と桁違いに大きいためである。すなわち、水晶振動子 11 の電極 11b 上に抗 2-MIB 抗体を固定化し、この抗体に被測定溶液中の 2-MIB を直接結合させて測定する場合には、2-MIB の結合による質量変化となるので質量変化が小さく、測定感度が低い。これに比べて、水晶振動子 11 の電極 11b 上にカンファー・オボアルブミン複合体を固定化し、このカンファー・オボアルブミン複合体に抗 2-MIB 抗体を結合させると、その質量変化は約 3 桁も大きくなるので、測定の感度が著しく高くなり高精度の測定が可能となるからである。

【0040】上記の実施例の場合とは異なり、濃度測定の対象となる物質 (抗原) の分子量が大きい場合には、水晶振動子 11 の電極 11b 上にその物質に対応する抗体を固定化した溶液測定用センサを使用することによって、その物質の濃度を測定対象溶液から直接測定することができる。この実施例においては、2-MIB の場合を説明したが、水晶振動子 11 の電極 11b 上に高分子膜として固定化する抗体や抗原の種類を変えることによって、2-MIB 以外の臭気物質や、農薬、油分などを定量することもできる。

【0041】また、上記の実施例における使用材料の量、処理時間、処理温度等の数値的な条件は一例に過ぎ

ず、この発明がこの数値に限定されるものでないことは明らかであろう。更に、上記実施例においては、測定対象になる溶液に既知濃度の抗体溶液を混合した溶液を被測定溶液 4 としたが、測定対象となる物質の分子量が大きい場合には、その物質の抗体を水晶振動子 11 の電極 11b 上に固定化して溶液測定用センサとし、測定対象溶液を被測定溶液 4 とすることができることも明らかであろう。

【0042】いずれの場合においても、酸性溶液 5 による免疫反応の解離と、切り替え手段による磷酸緩衝液 3 と被測定溶液 4 と酸性溶液 5 との切り替え及び廃棄・回収の切り替えとによって、特性が安定で、少量の被測定溶液で測定することができ、連続的に反応過程を測定することができ、反復利用が可能であり、安全性及び取扱い易さに優れている溶液測定用センサ及び溶液成分測定方法を提供することが可能となる。

【0043】

【発明の効果】この発明によれば、被測定溶液に接触してその溶液中の特定成分を測定する溶液測定用センサであって、高分子膜が形成された水晶振動子を用いたフロースルーセル式の溶液測定用センサにおいて、高分子膜は溶液に接触する側の水晶振動子の電極表面に固定化された抗原または抗体を含む膜であり、被測定溶液または抗体を添加された被測定溶液と磷酸緩衝液と酸性溶液とを切り換えて高分子膜表面へ供給する切替え供給手段が備えられているので、水晶振動子の高分子膜への各種溶液の供給が連続的に切り換え可能となる。その結果、連続的に反応過程を測定することが可能となり、且つ特性を安定化させることが容易となり、取扱いが容易になる。また、フロースルーセル構造にすることで溶液の置換が非常にスムーズになるため、被測定溶液等の溶液の必要量を少なくすることが可能となる。更に、酸性溶液の供給は反復利用を可能とする。

【0044】したがって、特性が安定で、少量の被測定溶液で測定することができ、連続的に反応過程を測定することができ、反復利用が可能で、安全性及び取扱い易さに優れている溶液測定用センサを提供することができる (請求項 1 の発明)。また、前記高分子膜が、固定化された抗原としてのカンファー・オボアルブミン複合体である。高分子膜に含まれる抗原がカンファー・オボアルブミン複合体である溶液測定用センサは、抗体の結合による出力変化を測定するので、特に低分子量の測定対象物質を検出するのに有効であり、優れた感度を有する。したがって、2-MIB に優れた選択性と感度とを有し、特性が安定で、少量の被測定溶液で測定することができ、連続的に反応過程を測定することができ、反復利用が可能で、安全性及び取扱い易さに優れている溶液測定用センサを提供することができる (請求項 2 の発明)。

【0045】更に、前記酸性溶液が、クエン酸溶液、磷

酸水素ナトリウムとクエン酸との混合溶液、あるいはグリシンの塩酸溶液であるので、結合した抗原と抗体とを効果的に解離させることができ、且つ入手が容易で、安全性及び取扱い易さに特に優れている。したがって、特性が安定で、少量の被測定溶液で測定することができ、連続的に反応過程を測定することができ、反復利用が可能で、特に安全性及び取扱い易さに優れている溶液測定用センサを提供することができる（請求項3の発明）。

【0046】以上の発明は溶液測定用センサに関する発明であるが、溶液成分測定方法としては次の発明がある。請求項1に記載の溶液測定用センサを用いた溶液成分測定方法であって、少なくとも、高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ磷酸緩衝液を流通させて基準発振周波数を計測する基準周波数計測工程と、高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ被測定溶液または抗体が添加された被測定溶液を流通させて抗原と抗体とを免疫反応させた後、磷酸緩衝液を流通させて免疫反応を安定させて、その免疫反応による周波数変化を計測する免疫反応計測工程と、高分子膜が形成された水晶振動子の電極表面へ酸性溶液を流通させて免疫反応により結合した抗原と抗体とを解離させる解離工程と、からなるので、溶液測定用センサを連続的に繰り返し使用することができるようになる。

【0047】したがって、特性が安定で、少量の被測定溶液で測定することができ、連続的に反応過程を測定することができ、反復利用が可能で、安全性及び取扱い易さに優れている溶液成分測定方法を提供することができる（請求項4の発明）。請求項4に記載の溶液成分測定方法において、切替え供給手段により溶液を切り換えた際に、フロースルーセルから回収されてくる溶液が切替え前の溶液と切替え後の溶液との混合液である可能性のある時間間隔の間は、その回収溶液を廃液側へ排出し、混合液でない時間間隔の間は、元の溶液に戻すので、被測定溶液等の溶液を有効に再利用することができる。したがって、必要な溶液量を更に少なくすることができ、同時に廃液量を低減することができる（請求項5の発明）。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明による液体測定用センサの実施例の構成を示す概念図

【図2】実施例におけるフロースルーセル素子の構成を示す斜視図

【図3】図2における水晶振動子とフレキシブル基板との位置関係を示す斜視図

【図4】図1の測定系による測定結果の1例を示す線図

【図5】酸性溶液の種類と繰り返し測定結果との関係を示す線図

【図6】酸性溶液として磷酸水素ナトリウムとクエン酸との混合溶液を用いた場合における繰り返し測定結果を示す線図

【図7】既知濃度の2-MIBによって得られた検量線を示す線図

【図8】従来技術による液体測定用センサの1例を用いた測定系の構成を示す概念図

【図9】従来技術による液体測定用センサの他例の構成を示す断面図

【符号の説明】

1 溶液測定用センサ

1a フロースルーセル素子

11 水晶振動子 111, 111a, 111b 電極

12 疎水性絶縁物

13 リード線

13a フレキシブル基板 131, 131a, 131b 端子
132 孔

14 保持基板 142 孔

15 シリコーンゴム

15a, 15b 高分子弾性シート

151a 151b 接液孔

152 孔

16 フロースルーセル蓋部

161 流入口 162 流出口

163 流入通路 164 流出通路

165 ネジ孔

17 固定ネジ

18 コネクタ

2, 2a, 2b, 2c ビーカ

3 リン酸緩衝液

4 被測定溶液

5 酸性溶液

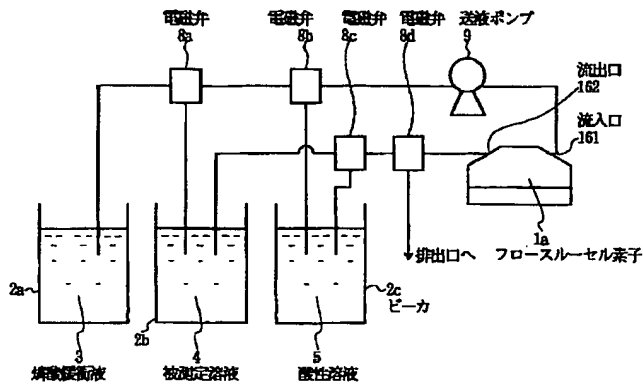
61 発振回路 62 周波数カウンタ

63 パソコン

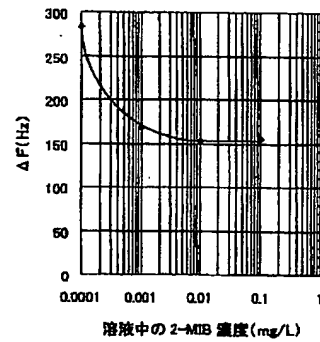
8a, 8b, 8c, 8d 電磁弁

9 送液ポンプ

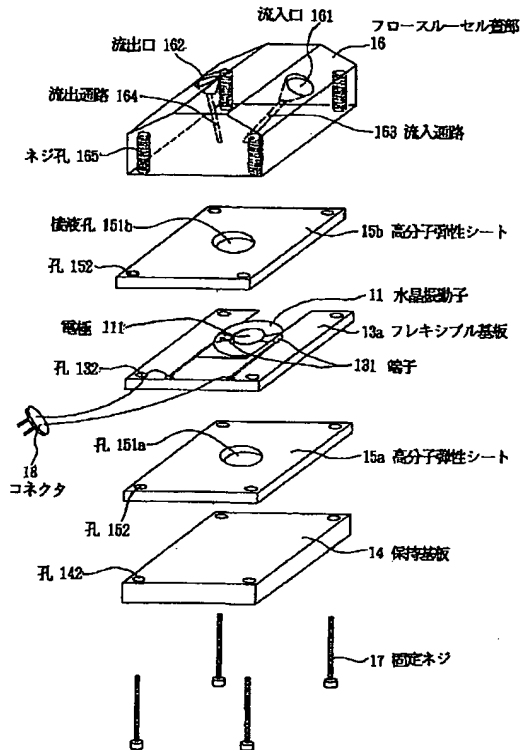
【図1】



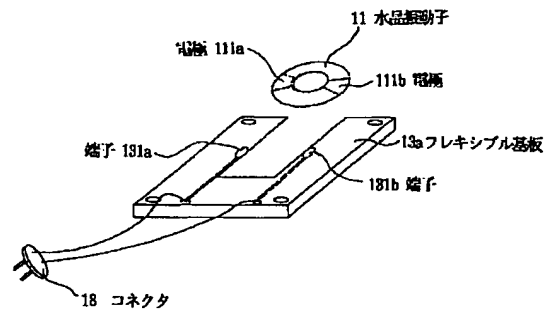
【図7】



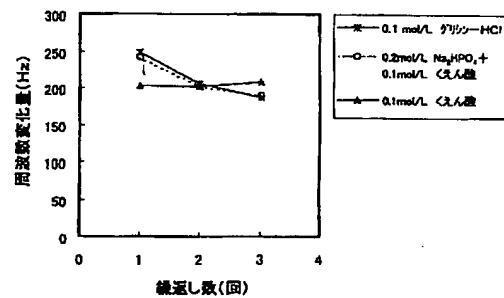
【図2】



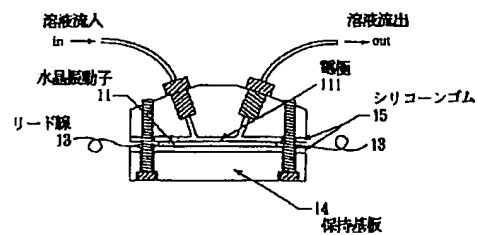
【図3】



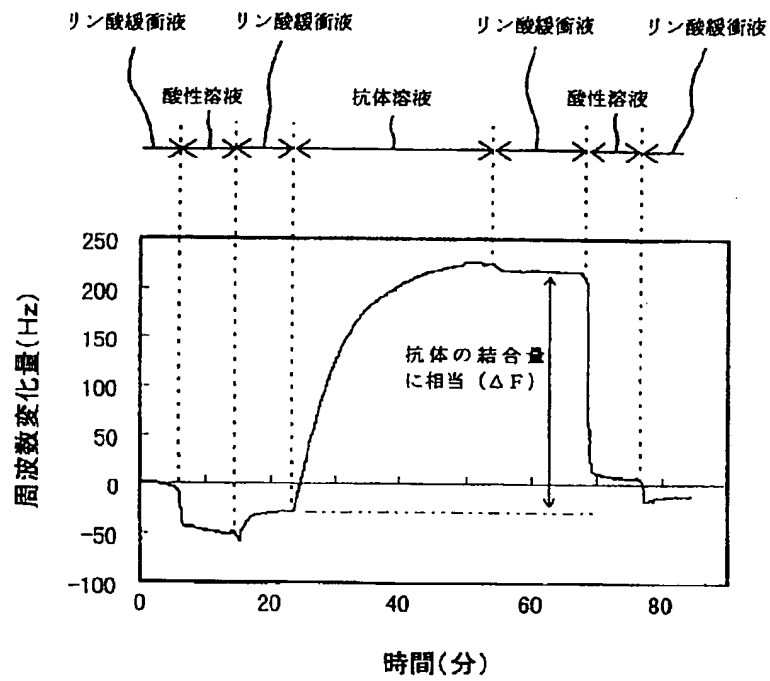
【図5】



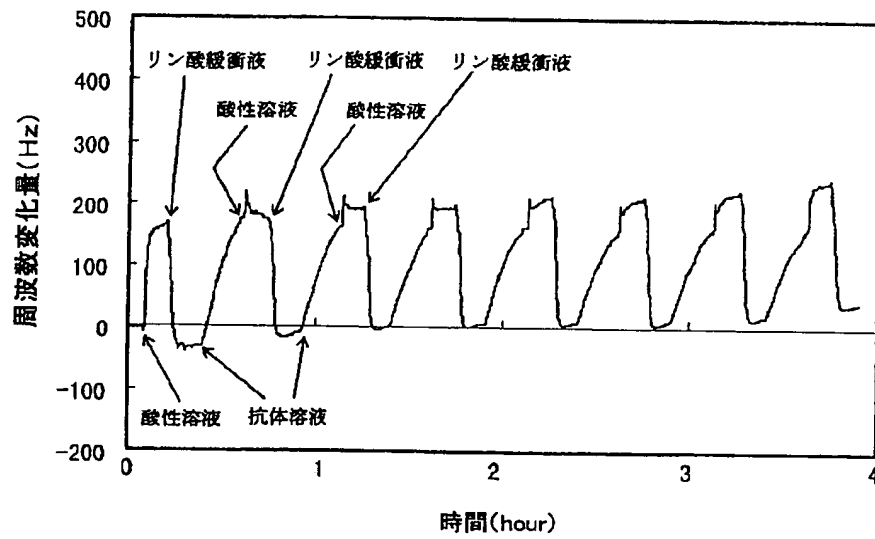
【図9】



【図4】



【図6】



【図8】

